



TITLE:

# テロメア維持機構の分子生物学的 解明

AUTHOR(S):

石川, 冬木

---

CITATION:

石川, 冬木. テロメア維持機構の分子生物学的解明. 2006

ISSUE DATE:

2006-05

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/85021>

RIGHT:

学術雑誌掲載論文の抜き刷り、出版社に著作権許諾が得られていないため未掲載。

テロメア維持機構の分子生物学的解明

13854026

平成 13 年度ー平成 17 年度科学研究費補助金

(基盤研究 (S) ) 研究成果報告書

平成 18 年 5 月

研究代表者 石川 冬木

京都大学 大学院 生命科学研究科教授

京 都 大 学 図 書



1060664842

附 属 図 書 館

テロメア維持機構の分子生物学的解明

13854026

平成 13 年度～平成 17 年度科学研究費補助金

(基盤研究 (S) ) 研究成果報告書

平成 18 年 5 月

研究代表者 石川 冬木

京都大学 大学院 生命科学研究科教授

## はしがき

本研究では、テロメアの維持機構を分子レベルで解析することを目的とした。テロメアは、多数種の分子から構成される複雑な複合体である。そのような構造体を理解するためには、複数のモデル生物を用いて異なる角度から解析を行い、その結果を総合させる必要がある。また、テロメアのように基本的な構造体の維持機構は、種を越えて保存されている場合が多いので、一つのモデル生物で得られた結果は、他の生物でも成立することが十分に期待され、複数のモデル生物のそれぞれの利点を生かすことで、研究が相乗的に展開しうる。本研究では、最も単純で遺伝学的な解析が可能かつヒトと類似点の多い分裂酵母を一つのモデル生物とする一方、生化学的な解析が容易なほ乳類および *Xenopus* を第二のモデル系として解析した。一研究室内において、このような異なる特徴をもつモデル生物を同時並行的に推進する「メタ生物学研究」によってテロメアの分子維持機構の理解を深めると共に、次に、どのような局面でテロメア機能に確率論的な多様性が生まれるかを明らかにすることができた。そうして得られた知見の一部は、細胞のがん化や老化に関して有用な情報を与え、その治療法を考える際に役立つものと期待された。

## 研究組織

氏 名	所属研究機関・部局・職	現在の専門	役割分担 (研究実施計画に対する分担事
石川 冬木	京都大学・ 大学院生命科学研究科・教授	分子生物学	分裂酵母と脊椎動物を用いた 生化学的解析および全体のま とめ
加納 純子	京都大学・ 大学院生命科学研究科・助手	分子生物学	分裂酵母を用いた遺伝学的解 析
鍋谷 彰	京都大学・ 大学院生命科学研究科・助手	分子生物学	脊椎動物を用いた生化学的解 析

交付決定額（配分額）

	直接経費	間接経費	合計
平成 13 年度	18,800,000 円	5,640,000 円	24,440,000 円
平成 14 年度	19,000,000 円	5,700,000 円	24,700,000 円
平成 15 年度	19,000,000 円	5,700,000 円	24,700,000 円
平成 16 年度	19,000,000 円	5,700,000 円	24,700,000 円
平成 17 年度	19,000,000 円	5,700,000 円	24,700,000 円
総計	94,800,000 円	28,440,000 円	123,240,000 円

研究発表

[学会誌等]

1. Hoque, T., and Ishikawa, F. : Human chromatid cohesin component hRad21 is phosphorylated in M phase and associated with metaphase centromeres, *J. Biol. Chem.* 276:5059-5067, 2001
2. Ohno, J., Horio, Y., Sekido, Y., Hasegawa, Y., Takahashi, M., Nishizawa, J., Saito, H., Ishikawa, F. and Shimokata, K.: Telomerase activation and p53 mutations in urethane-induced A/J mouse lung tumor development. *Carcinogenesis*. 22: 751-756, 2001
3. Ohki, R., Tsurimoto, T., and Ishikawa, F.: *In vitro* reconstitution of the end-replication problem. *Mol. Cell. Biol.* 21: 5753-5766, 2001
4. Kuramoto, M., Ohsumi, K., Kishimoto, T., and Ishikawa, F.: Identification and analyses of the *Xenopus* TERT gene that encodes the catalytic subunit of telomerase. *Gene* 277: 101-110, 2001
5. Kanoh, J., and Ishikawa, F.: SpRap1 and spRif1, recruited to telomeres by Taz1, are essential for telomere function in fission yeast. *Curr. Biol.* 11: 1624-1630, 2001
6. Katahira, M., Miyanoiri, Y., Enokizono, Y., Matsuda, G., Nagata, T., Ishikawa, F. and Uesugi, S.: Structure of the C-terminal RNA-binding domain of hnRNP D0 (AUF1), its interactions with RNA and DNA, and change in backbone dynamics upon complex formation with DNA. *J. Mol. Biol.* 311:973-988, 2001
7. Yago, M., Ohki, R., Hatakeyama, S., Fujita, T. and Ishikawa, F.: Variant forms of upstream stimulatory factors (USFs) control the promoter activity of *hTERT*, the human gene encoding the catalytic subunit of telomerase. *FEBS Letters*. 520:40-46, 2002
8. Haraguchi, M., Tsujimoto, H., Fukushima, M., Higuchi, I., Kuribayashi, H., Utsumi, H.,

- Nakayama, A., Hashizume, Y., Hirato, J., Yoshida, H., Hara, H., Hamano, S., Kawaguchi, H., Furukawa, T., Miyazono, K., Ishikawa, F. Toyoshima, H., Kaname, T., Komatsu, M., Chen, Z.S., Gotanda, T., Tachiwada, T., Sumizawa, T., Miyadera, K., Osame, M., Yoshida, H., Noda, T., Yamada Y. and Akiyama, S.: Targeted deletion of both thymidine phosphorylase and uridine phosphorylase and consequent disorders in mice. *Mol. Cell. Biol.* 22: 5212-5221, 2002
9. Kanzaki Y, Onoue, F., Ishikawa F. and Ide, T.: Telomerase rescues the expression levels of keratinocyte growth factor and insulin-like growth factor-II in senescent human fibroblasts. *Exp. Cell Res.* 279: 321-329, 2002
  10. Kim, M., Yuan, X. Okumura, S. and Ishikawa F.: Successful inactivation of endogenous Oct-3/4 and c-mos genes in mouse preimplantation embryos and oocytes using short interfering RNAs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 296: 1372-1377, 2002
  11. Saito, M. and Ishikawa, F.: The mCpG-binding domain of human MBD3 does not bind to mCpG but interacts with NuRD/Mi2 components HDAC1 and MTA2. *J. Biol. Chem.*, 277: 35434-35439, 2002.
  12. Hoque, Md. T. and Ishikawa, F.: Cohesin defects lead to premature sister chromatid separation, kinetochore dysfunction and spindle-assembly checkpoint activation. *J. Biol. Chem.* 277: 42306-42314, 2002
  13. Sakai, H., Urano, T., Ookata, K., Kim, M.-H., Hirai, Y. Saito, M., Nojima, Y. and Ishikawa, F.: MBD3 and HDAC1, two components of the NuRD complex, are localized at Aurora-A-positive centrosomes in M phase. *J. Biol. Chem.* 277: 48714-48723, 2002
  14. Miyoshi, T., Sadaie, M., Kanoh, J. and Ishikawa, F.: Telomeric DNA ends are essential for the localization of Ku at telomeres in fission yeast. *J. Biol. Chem.* 278: 1924-1931, 2003
  15. Iwasa, H., Han, J. and Ishikawa, F.: Mitogen-activated protein kinase p38 defines the common senescence-signalling pathway. *Genes to Cells* 8: 131-144, 2003
  16. Takata, T. and Ishikawa, F.: Human Sir2-related protein SIRT1 associates with the bHLH repressors HES1 and HEY2 and is involved in HES1- and HEY2-mediated transcriptional repression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301: 250-257, 2003
  17. Kanoh, J., Francesconi, S., Collura, A., Schramke, V., Ishikawa, F., Baldacci, G. and Geli, V.: The Fission yeast spSet1p is a histone H3-K4 methyltransferase that functions in telomere maintenance and DNA repair in an ATM kinase Rad3-dependent

- pathway. *J. Mol. Biol.* 326: 1081-1094, 2003
18. Sadaie, M., Naito, T. and Ishikawa, F.: Stable inheritance of telomere chromatin structure and function in the absence of telomeric repeats. *Genes Dev.* 17: 2271-2282, 2003
  19. Yoshimura, S.H., Maruyama, H., Ishikawa, F., Ohki, R. and Takeyasu, K.: Molecular mechanisms of DNA end-loop formation by TRF2. *Genes to Cells* 9: 205-218, 2004
  20. Ohki, R. and Ishikawa, F.: Telomere-bound TRF1 and TRF2 stall the replication fork at telomeric repeats. *Nucl. Acids Res.* 32: 1627-1637, 2004
  21. Nabetani, A., Yokoyama, O. and Ishikawa, F.: Localization of hRad9, hHus1, hRad1, and hRad17 and caffeine-sensitive DNA replication at the alternative lengthening of telomeres-associated promyelocytic leukemia body. *J. Biol. Chem.* 279:25849-25857, 2004
  22. Okumura-Nakanishi, S., Saito, M., Niwa, H. and Ishikawa, F.: Oct-3/4 and sox2 regulate oct-3/4 gene in embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* 280: 5307-5317, 2005
  23. Enokizono, Y., Konishi, Y., Nagata, K., Ouhashi, K., Uesugi, S., Ishikawa, F. and Katahira, M.: Structure of hnRNP D complexed with single-stranded telomere DNA and unfolding of the quadruplex by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D. *J. Biol. Chem.* 280 :18862-18870, 2005
  24. Kanoh, J., Sadaie, M., Urano, T. and Ishikawa, F. :Telomere-Binding Protein Taz1 Establishes Swi6 Heterochromatin Independently of RNAi at Telomeres. *Curr. Biol.* 15 :1808-1819, 2005
  25. Nakamura, M., Nabetani, A., Mizuno, T., Hanaoka, F., and Ishikawa, F. :Alterations of DNA and Chromatin Structures at Telomeres, and Genetic Instability in Mouse Cells Defective in DNA Polymerase  $\alpha$ . *Mol. Cell. Biol.*, 25 :11073-11088, 2005
  26. Nishiyama, A., Muraki, K., Saito, M., Ohsumi, K., Kishimoto, T., and Ishikawa, F. :Cell-cycle-dependent Xenopus TRF1 recruitment to telomere chromatin regulated by Polo-like kinase. *EMBO J.* 25 :575-584, 2006
  27. Kanoh, J. Ishikawa, F. (Review): Composition and conservation of the telomeric complex. *Cell. Mol. Life Sci.*, 60: 2295-2302, 2003.
  28. Ishikawa, F. (Review): Cellular senescence, an unpopular yet trustworthy tumor suppressor mechanism. *Cancer Sci.*, 94: 944-947, 2003.
  29. Nishiyama, A. and Ishikawa, F. (Review): Cell-cycle-dependent Regulation of Telomere Binding Proteins: Roles of Polo-like kinase. *Cell Cycle*, in press

[口頭発表]

海外

1. Rieko Ohki, Toshiki Tsurumoto and Fuyuki Ishikawa: Analysis of the Effect of Telomere Binding Proteins on Telomere Replication Using in Vitro System for Linear DNA Replication. Cold Spring Harbor Meeting: Eukaryotic DNA Replication (NY, U.S.A.) Sep, 2001
2. Hiroaki Iwasa and Fuyuki Ishikawa: Mitogen-Activated Protein Kinase P38 Defines The Common Senescence-Signaling Pathway. Cold Spring Harbor Meeting: Molecular Genetics of Aging (NY, U.S.A.) Oct, 2002
3. Atsuya Nishiyama, Rieko Ohki and Fuyuki Ishikawa: XENOPUS TRF1 Associates with Chromatin in a Cell-Cycle Dependent Manner. Cold Spring Harbor Meeting: Telomere and Telomerase (NY, U.S.A.) April, 2003
4. Fuyuki Ishikawa: Mitogen-activated protein kinase p38 defines the common senescence-signaling pathway. XIX International Congress on Genetics Genomes (Melbourne, Australia) July, 2003
5. Fuyuki Ishikawa: Mitogen-activated protein kinase p38 defines the common senescence-signaling pathway. UK-Japan Conference 'Horizons in Aging and Health: New Targets for Therapies' (Newcastle, UK) July, 2003
6. Atsuya Nishiyama and Fuyuki Ishikawa: XENOPUS Telomere Binding Factor1(xTRF1) Associates with Chromatin in Cell-Cycle Dependent Manner. Cold Spring Harbor Meeting: Eukaryotic mRNA Processing (NY, U.S.A.) Nov, 2003
7. Fuyuki Ishikawa: Replication at Telomeres. The 3rd International Fission Yeast Meeting: POMBE 2004 (San Diego, U.S.A.) Aug, 2004
8. Fuyuki Ishikawa: Replication of Telomeric Heterochromatin. AACR Conference: The Role of Telomeres and Telomerase in Cancer (San Francisco, U.S.A.) Nov, 2004
9. Fuyuki Ishikawa: Telomeres, the Heels of Achilles in Chromosomes. Kyoto University-Nus International Symposium (The 5<sup>th</sup> Kyoto University International Symposium): Regulation of cell fate and cell function (Singapore) Jan, 2005
10. Fuyuki Ishikawa: Dynamic Behaviors of Telomeric Chromatin Reconstituted in Xenopus Egg Extracts. Cold Spring Harbor Meeting: Telomere and Telomerase (NY, U.S.A.) May, 2005
11. Junko Kanoh, Mahito Sadaie, Takeshi Urano and Fuyuki Ishikawa: TAZ1 and RNAi Independently Establish Telomere Heterochromatin. Cold Spring Harbor Meeting:



Telomere and Telomerase (NY, U.S.A.) May, 2005

国内

1. Fuyuki Ishikawa: Identification of Telomere Reverse Transcriptase in *Xenopus*. VRIA(Virtual Reseach Institute of Aging) Annual Meeting 2001 (Tokyo) Oct, 2001
2. Fuyuki Ishikawa: Telomere, Stress Responses and anti-tumor effects. International Symposium on Tumor Biology (Kanazawa) March, 2002
3. Robin Allshire, Yuji Chikashige, Julia P. Cooper, Karl Ekwall, Shiv Grewal, Fuyuki Ishikawa, Osami Niwa, Kohta Takahashi, Yoshinori Watanabe: Fission Yeast Telomere Components. The 2nd Internationals Fission Yeast Meeting: POMBE 2002 (Kyoto) March, 2002
4. Fuyuki Ishikawa: Telomerase in *Xenopus*. VRIA(Virtual Reseach Institute of Aging) Annual Meeting 2002 (Tokyo) Sep, 2002
5. Fuyuki Ishikawa: Telomere-binding proteins and telomeric DNA replication. The 19th RBC International Symposium: Crisis Control in the Cell Cycle (Kyoto) Nov, 2002
6. Fuyuki Ishikawa: Cellular Stress, Senescence and Anticancer Effects. 18th Bristol-Myers Squibb Nagoya International Cancer Treatment Symposium & Meet the Expert (Nagoya) Nov, 2002
7. Fuyuki Ishikawa: p38MAPK Induces Cellular Senescence in Response to Variety of Cellular Stresses. The 67th Annual Meeting of the Japanese Circulation Society (Fukuoka) March, 2003
8. Atsuya Nishiyama, Rieko Ohki and Fuyuki Ishikawa: XENOPUS TRF1 Associates with Chromatin in a Cell-Cycle Dependent Manner. Fifty-Sixth Annual Meeting of The Japan Society for Cell Biology (Otsu) May, 2003
9. Fuyuki Ishikawa: Functional studies on human Sir2. VRIA (Virtual Reseach Institute of Aging) Annual Meeting 2003 (Kyoto) Sep, 2003
10. Fuyuki Ishikawa: Cellular senescence as a physiological response to stresses. The 76th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society (Yokohama) Oct, 2003
11. Fuyuki Ishikawa: XENOPUS Telomere Binding Factor1 (xTRF1) Associates with Chromatin in Cell-Cycle Dependent Manner. The 4th International 3R Symposium (Awaji, Hyogo) Nov, 2003
12. Fuyuki Ishikawa: Stable inheritance of telomere chromatin structure and function in the absence of telomeric repeats. International Symposium: Genome Stability and Mechanism of Chromosome Segregation (Otsu) Dec, 2003

13. Fuyuki Ishikawa: Dynamic behaviors of telomere chromatin structures during the cell cycle. The 26th Annual Meeting the Molecular Biology Society of Japan (Kobe) Dec, 2003
14. Fuyuki Ishikawa: Mitogen-activated protein kinase p38 defines the common senescence-signaling pathway. The 6th Japan- Korea Workshop on Cancer and Aging Research (Tokushima) Feb, 2004
15. Fuyuki Ishikawa: Life and Death at Telomeres. International Workshop for Integrated Yeast Sciences (Naha, Okinawa) March, 2004
16. Fuyuki Ishikawa: Cell cycle-dependent controls of telomeres. 5th UK-Japan Cell Cycle Workshop (Nara) April, 2004
17. Fuyuki Ishikawa: Replication of Telomeric Heterochromatin. The 77th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society (Yokohama) Oct, 2004
18. Atsuya Nishiyama and Fuyuki Ishikawa: Dynamic Behaviors of Telomeric Chromatin Structures during Cell Cycle. International Cell Cycle Symposium: Cell Death, Cell Cycling, Cell Senescence (Kisarazu, Chiba) Nov, 2004
19. Fuyuki Ishikawa: Stress Responses at Telomeres. International Symposium on Ran and Cell Cycle (Awaji, Hyogo) Oct, 2005
20. Fuyuki Ishikawa: Cell-cycle-dependent Modification of Telomere Chromatin Structure. Japan-Taiwan Symposium on Cell Signaling and Gene Expression (Kobe) Nov, 2005
21. Fuyuki Ishikawa: Telomere Functions In DNA Replication And End Protection. Cancer Research in Korea and Japan – the Past and Coming Decade (Tokyo) Dec, 2005
22. Fuyuki Ishikawa: Reproduction Strategies And Configurations Of Genetic Materials. The 52nd NIBB Conference: Reproductive Strategies (Tokyo) Jan, 2006

[出版物]

1. 石川冬木 テロメアとゲノム維持機構・遺伝子の構造と機能. 山本雅之 (編集) 共立出版 25-36 (2001).
2. 石川冬木 (編集) 老化研究の最前線. Springer-Verlag 社 (東京) (2002).
3. 鍋谷 彰、石川冬木 テロメアの維持機構とリプログラミング・再生医学. 須田年生、岡野栄之 (編集) 中山書店 40:42-47 (2003).
4. 岩佐宏晃、石川冬木 テロメア DNA の複製と細胞老化-分裂回数を決定する染色体構造. DNA 複製・修復がわかる-わかる実験医学シリーズ- 花岡文雄 (編集) 羊土社 (東京) (2004).
5. 石川冬木 (企画) 発がん課程における染色体ダイナミクス. 医学のあゆみ. 医歯薬出版 (東京) (2004).

研究成果による工業所有権の出願・取得状況

なし

## 研究成果

### (1) 分裂酵母を用いたテロメア研究

本研究開始時には、分裂酵母 2 本鎖テロメア DNA 結合蛋白質として Taz1 が、1 本鎖結合蛋白質として Pot1 が知られていたが、本研究により、Taz1 結合蛋白質として Rap1 および Rif1 を (Kanoh et al. 2001)、Pot1 結合蛋白質として Ccq1 および Poz1 を同定した (未発表) (図 1)。特に、Rap1 はテロメア長、減数分裂前期におけるテロメアの核内再配置、テロメアヘテロクロマチン形成に重要な役割を果たす。Poz1 と Ccq1 はともにテロメア長およびテロメアヘテロクロマチン形成に関わる。一般に、テロメアのような染色体機能ドメインは、テロメア繰り返し配列のようなシス配列とそれを認識する Taz1 のような結合蛋白質が複合体を作り、蛋白質間相互作用によりさらに大きな複合体形成をすることで形作られるものと信じられている。しかし、我々は分裂酵母染色体が環状化してテロメア配列を失う過程で、少なくとも一部のテロメア機能が維持されることを見いだした (Sadaie et al. 2003)。このことは、シス配列が失われても機能を維持するエピジェネティックな機構の存在を示唆している。さらに、そのようなテロメア配列非依存的なテロメア維持機構の可能性のひとつとして、RNA を介した機構を同定した (Kanoh et al. 2005)。

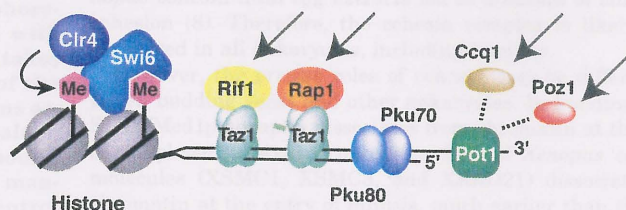


図 1：分裂酵母のテロメア分子構造、矢印は本研究であらたに同定された新規因子

図 1：分裂酵母のテロメア分子構造、矢印は本研究であらたに同定された新規因子

### (2) *Xenopus* 卵抽出液を用いたテロメア研究

最近までテロメアは細胞周期にわたってその構造を変えることのない静的な構造物であると信じられてきた。我々は、カエル卵抽出液中でのテロメア構造の細胞周期にわたる変化を観察する系を確立し、テロメア結合蛋白質 TRF1 が M 期テロメアクロマチンには結合するものの、S 期クロマチンから解離すること、TRF2 は細胞周期を通じて結合していること、テロメラーゼは TRF1 と反対に S 期クロマチンに結合することを見いだした (Nishiyama et al. 2006、図 2)。このような細胞周期にわたる動的なテロメアクロマチン構造の変化が明らかとなったのは本研究が初めてである。

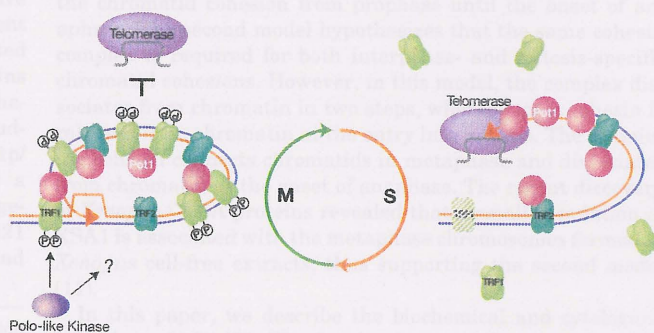


図 2：カエル卵抽出液中におけるテロメア構造の細胞周期依存的な動的変化

### (3) ほ乳類細胞を用いたテロメア研究

SV40 試験管内複製系は、DNA 複製の基本反応の解明に貢献した歴史をもつ。本研究では、この系をテロメア複製という座位特異的な複製反応の解析に応用した。まず、SV40 線状 DNA を試験管内複製させる系を確立し、従来細胞内で観察されていたのみであった末端複製問題の試験管内再構成に成功した (Ohki et al. 2001)。次に、本系を用いてテロメア DNA 自身が複製反応のよい基質ではないこと、TRF1, TRF2 と結合したテロメアクロマチンはさらに複製が困難で、フォーク停止が高頻度で起こることを見いだした (Ohki et al. 2004)。このことを細胞内で観察するために、DNA 合成酵素  $\alpha$  の温度感受性突然変異をもつマウス細胞 tsFT20 を用いて同酵素の機能を低下させたところ、テロメア機能構造の変化とテロメア機能喪失に基づくと思われる特徴的な染色体異常が起こることが分かった (Nakamura et al. 2005)。以上のことから、テロメアはゲノム内でも最も複製が困難な「アキレス腱」に相当することが示唆された。